



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 42 19 626 A 1

51 Int. Cl.⁵:
C 12 N 15/79
C 07 K 15/00
A 61 K 48/00

21 Aktenzeichen: P 42 19 626.4
22 Anmeldetag: 18. 8. 92
43 Offenlegungstag: 23. 12. 93

DE 42 19 626 A 1

71 Anmelder:
Wehling, Peter, Priv.-Doz. Dr.med., 4000 Düsseldorf,
DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

54 Methode zur Einschleusung therapeutisch relevanter Gene in Körperzellen

57 Das Patent betrifft eine neuartige Therapiemethode zur Anwendung insbes. bei degenerativen Erkrankungen der Wirbelsäule und der Nerven, bei der entweder
1) therapeutische Gene mittels Vektoren direkt in Körperzellen (in vivo) eingebracht werden, so daß diese gentechnisch veränderten Zellen therapeutische Proteine exprimieren, die sie vorher nicht in der Lage waren, herzustellen oder
2) Körperzellen aus dem Zielgebiet in vivo entnommen werden, diese Zellen in vitro über Vektoren einen anderen Gencode erhalten, und dieser Gencode therapeutische Proteine exprimiert, die er vorher nicht in dieser Quantität oder Qualität herstellen konnte und diese gentechnisch veränderten Zellen in den Körper retransplantiert werden. Die therapeutischen Gene und Proteine stammen insbesondere aus der Gruppe der Zytokininhibitoren bzw. deren Gencode, die betroffenen Zellen stammen v. a. aus der Wirbelsäule und aus Nerven.
Die Vektoren für die therapeutischen Gene sind insbesondere Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpesviren oder Liposomen.

DE 42 19 626 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 93 308 051/33

7/54

1. Einleitung

Degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates insbesondere der Wirbelsäule stellen den häufigsten Erkrankungstyp des älteren Menschen dar. Nach Untersuchungen des "National Center for Health Statistics" leiden annähernd 500 von 1000 Personen über 65 Jahren an degenerativen Erkrankungen. Die Zahlen dürften für die Bundesrepublik ähnlich hoch liegen.

Bandscheibe und Wirbelsäulengelenke sind Organe, die mit Medikamenten schwierig zu erreichen sind. Intravenöse und orale Verabreichungen von Medikamenten mit potentiell analgetischer und arthrosehemmender Wirkung erreichen nur bedingt den Bandscheibenraum bzw. den Innenraum arthrotisch veränderter kleinen Wirbelgelenke, da die entsprechenden Strukturen verminderten Anschluß an das vaskuläre System haben. Vermindert werden die Gewebespiegel therapeutischer Substanzen in der Bandscheibe und den kleinen Wirbelgelenke außerdem durch die passive Diffusion von den Kapillaren in die Bandscheibe bzw. den Gelenkinnenraum. Dabei gilt, daß je größer das verabreichte Molekül ist, um so niedriger die Diffusion in diese Zielgebiete ist. Der Zugang von großen therapeutisch wirksamen Molekülen (z. B. Proteinen) in diese Areale ist damit wesentlich erschwert.

Obwohl intraartikuläre und intradiskale Injektionen einen direkten Zugang von Medikamenten ermöglichen und damit die genannten Probleme umgehen, haben therapeutisch interessante Substanzen (z. B. IL-1 Antagonisten) eine kurze Halbwertszeit im Gewebe. Wegen der Chronizität sind viele Injektionen erforderlich. Wiederholte Injektionen bergen das Risiko der bakteriellen Infektion.

Bisher ist es daher üblich, systemisch mit hohen Gewebespiegeln zu therapieren, um so eine effektive therapeutische Dosis in der Zielstruktur (Bandscheibe u. Wirbelgelenke) zu erlangen. Allgemeine Nebenwirkungen werden damit begünstigt.

Das gleiche gilt auch für die Therapie von Nervenerkrankungen. Bedingt durch die Ausbildung der Bluthirnschranke sind Anwendungen großer therap. Proteine sehr erschwert.

2. Gentherapie bei Wirbelsäulenerkrankungen

Das grundlegende therapeutische Konzept des molekularbiologischen Ansatzes des Patentes liegt darin, den Gencode der Chondrozyten, Fibroblasten und Nervenzellen der Wirbelsäule so zu verändern, daß diese Zellen Proteine mit therapeutischen Eigenschaften synthetisieren (Beispiel Wirbelgelenke Abb. 1). Im Falle der Expression der Gene synthetisieren und sezernieren Chondrozyten, Neurone und Fibroblasten antiinflammatorische und analgetische Moleküle in den Bandscheibenraum oder in den Gelenkinnenraum.

Durch diesen Zugang kann das Repertoire der z.Z. therapeutisch genutzten relativ kleinen Moleküle auf neue größere Proteine ausgeweitet werden. Dies wäre von Vorteil, da einige Proteine (z. B. Hemmstoffe der Zytokine) Eigenschaften aufweisen, die sie für die o.g. Erkrankungen favorisieren. Wegen ihrer Größe, schlechten Penetration in die bradytrophen Gewebe und wegen ihrer physiologischen Instabilität wurden bisher solche Substanzen auf ihren praktischen therapeu-

peutischen Nutzen nur wenig untersucht.

Der jetzige wissenschaftliche Stand in der Diskussion der biochemischen Verursachung degenerativer Erkrankungen des Bewegungsapparates läßt den Schluß zu, daß Interleukin-1 (IL-1) der entscheidende Mediator der pathologischen Veränderungen ist (3, 10). IL-1 ruft synoviale Entzündung, Knorpelverlust und Knochenresorption hervor (2, 5, 6, 7). In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen IL-1 den Ausprägungsgrad der experimentellen Arthritis wesentlich abschwächen (10). Auch erste klinische Untersuchungen zur Behandlung der Arthrose mit IL-1 Rezeptorantagonisten (IRAP) erscheinen vielversprechend (1, 4). Im Zusammenhang degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen ist das Zusammenspiel der Interleukine mit dem peripheren Nervensystem von besonderem Interesse (9).

Mit Blick auf diesen Hintergrund wird vom Erfinder vorgeschlagen, ein Gentransfersystem bei degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen und degenerativen Nervenerkrankungen einzuführen, das insbesondere die Wirkungen von IL-1 mit einem neuartigen Gentransfersystem antagonisiert. Dabei konnte entweder das Gen für IRAP oder für einen IL-1 Rezeptor in Fibroblasten, Chondrozyten und Neuronen codiert werden. Mit diesem gentechnischen Transfersystem lassen sich aber auch zusätzliche oder alternative Gene für andere therapeutische Proteine in die Wirbelgelenke, Nerven oder in den Bandscheibenraum einbringen.

3. Strategien des Gentransfers

2 verschiedene Systeme werden vom Erfinder vorgeschlagen (Abb. 2).

Der direkte Zugang wird durch Injektion eines Vektors in die kleinen Wirbelgelenke, in die Bandscheibe oder in den peripheren Nerven möglich, der Fibroblasten, Chondrozyten und Nervenzellen in situ überträgt (linke Seite Abb. 2).

Beim indirekten Zugang wird Bandscheibengewebe, Fibroblasten und Chondrozyten der kleinen Wirbelgelenke oder Nerv entnommen, diese Zellen in vitro verändert und in das Entnahmegebiet retransplantiert (rechte Seite Abb. 2).

Mit Hinblick auf die Entwicklung in der Endoskopie erscheint der indirekte Zugang für einen chirurgisch klinischen Einsatz besonders elegant, während der direkte Zugang technisch einfacher durchzuführen ist und eine allgemeine klinische Anwendung damit erleichtert wird.

Der direkte Zugang wird aber durch die Unfähigkeit des retroviralen Vektors erschwert, ruhende Zellen in situ zu infizieren, da Retroviren Zellteilung zur Infektion benötigen. Allerdings kann die Zellteilung durch Entzündung, Verletzung oder partielle Gewebeentnahme selbst angeregt werden. Andere Vektoren (z. B. Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren oder Herpesviren) infizieren auch nicht teilende Zellen, so daß diese Vektoren die vorgenannten Probleme umgehen könnten.

Beim jetzigen Stand der Entwicklung ist zu erwarten, daß der indirekte Zugang als effektiver anzusehen ist, da die Kotransduktion eines selektiven Markers eine Identifikation teilender Zellen ermöglicht.

4. Experimente

Nach Entnahme der Fibroblasten, Chondrozyten und Nerven aus den kleinen Wirbelgelenken, der Bandscheibe und dem Nervenkanal im Tierexperiment wurden die

angelegten Zellkulturen mit einem Retrovirus infiziert (BAG-Virus oder MFGLac-Z Virus) der Marker Gene für B-Galactosidase (lac Z) enthält und gegenüber dem Neomycin Analog (G 418 neo +) resistent ist.

Diese neo-selektierten Zellen (Menge 10^6) wurden in den ursprünglichen Gewebereich (Bandscheibe, kleine Wirbelgelenke und Nerv) retransplantiert, um die Persistenz und Expression dieser Gene in ihrer natürlichen Umgebung in vivo zu untersuchen.

12 Wochen nach Transplantation (s. Abb. 3 Histologie) konnte ein Überleben dieser gentechnisch veränderten Zellen in ihrer natürlichen Umgebung beobachtet werden, erkennbar an der dunkelblauen Färbung der Zellen. Es zeigte sich außerdem eine regelrechte Kolonisation. Aus dem dann wieder entnommenen Gewebe konnten diese veränderten Zellen in vitro erneut untersucht werden. Eine Abstoßungsreaktion zeigte sich nicht. Die Experimente zeigen eindeutig, daß ein Marker-Gen in diese Zellen eingebracht werden kann, das sich in situ exprimieren kann.

Außerdem gelang es bei Fibroblasten, Chondrozyten und Neuronen den Gen-Code für einen Interleukin-1 Rezeptorantagonisten in einen Retrovirus zu inkorporieren. Die Zellen, die mit diesem Virus infiziert wurden, waren in der Lage, Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten zu produzieren.

5. Klinische Perspektive

Durch die gentechnisch mögliche Veränderung der Eigenschaften der Fibroblasten, Nervenzellen und Chondrozyten ergibt sich eine neuartige Strategie in der Behandlung schmerzhafter degenerativer Erkrankungen der Bandscheibe (Abb. 5), des Nerven (Abb. 4) und der kleinen Wirbelgelenke (Abb. 5).

Beim jetzigen Stand müssen die beschriebenen Verfahren verfeinert, ausgeweitet und auf ihre Sicherheit in größeren Serien untersucht werden.

Besonders interessant erscheint therapeutisch die Möglichkeit, Gene mit antagonisierender Wirkung von IL-1 zu transduzieren.

Die o.g. gentechnologischen Verfahren in Verbindung mit Transplantationstechniken aus der Endoskopie (z. B. transarthroskopische Synovektomie und Diskektomie) werden einen innovativen Schub in der Behandlung dieser Erkrankungen erwarten lassen.

Da es sich bei dem Patentgegenstand prinzipiell um eine somatische Gentherapie handelt, ist ein Verstoß gegen ethische Normen nicht gegeben.

Abb. 1 Das grundlegende therapeutische Konzept des molekularbiologischen Ansatzes liegt darin, den Gencode der Chondrozyten und der Fibroblasten der kleinen Wirbelgelenke und der Bandscheibe so zu verändern, daß diese Zellen Proteine mit therapeutischen Eigenschaften synthetisieren. Im Falle der Expression der Gene synthetisieren und sezernieren Chondrozyten und Fibroblasten (wie hier dargestellt) antiinflammatorische und analgetische Moleküle in den Gelenkinnenraum.

Abb. 2 direkter und indirekter Zugang am Beispiel der kleinen Wirbelgelenke.

Der direkte Zugang wird durch Injektion eines Vektors in die kleinen Wirbelgelenke, in die Bandscheibe oder in den peripheren Nerven möglich, der Fibroblasten, Chondrozyten und Nervenzellen in situ überträgt (linke Seite Abb. 2).

Beim indirekten Zugang wird Bandscheibengewebe, Fibroblasten und Chondrozyten der kleinen Wirbelge-

lenke oder Nerv entnommen, diese Zellen in vitro verändert und in das Entnahmegerbiet retransplantiert (rechte Seite Abb. 2).

Abb. 3 (Histologie): Histologische Darstellung von Fibroblasten der Bandscheibe des Kaninchens nach Transplantation gentechnisch veränderter Zellen. Die dunkel gefärbten Gewebeanteile entsprechen Fibroblasten, die zuvor außerhalb des Kniegelenkes gentechnisch verändert und retransplantiert wurden.

12 Wochen nach Transplantation (s. Abb. 3 Histologie) konnte ein Überleben dieser gentechnisch veränderten Zellen in ihrer natürlichen Umgebung beobachtet werden, erkennbar an der dunkelblauen Färbung der Zellen. Es zeigte sich außerdem eine regelrechte Kolonisation. Aus dem dann wieder entnommenen Gewebe konnten diese veränderten Zellen in vitro erneut untersucht werden. Eine Abstoßungsreaktion zeigte sich nicht. Die Experimente zeigen eindeutig, daß ein Marker-Gen in diese Zellen eingebracht werden kann, das sich in situ exprimieren kann.

Abb. 4 Nerv: Anwendung der Erfindung bei Erkrankungen des Nerven. Therapeutische Gene werden in Makrophagen oder in Fibroblasten eingebracht, die dann therapeutische Proteine exprimieren.

Abb. 5 Wirbelsäule: Bildliche Darstellung der Anwendung der Erfindung, Möglichkeiten des Gentransfers an der Wirbelsäule (s. Text).

Literaturverzeichnis Gentherapie

1. Carter DB et al. (1990)
Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344, 633–638
2. Dingle JT, Saklatvala J, Hembry R, Tyler J, Fell HB, Jubb R (1979)
A cartilage catabolic factor from synovium. *Biochem. J.* 184, 177–180
3. Firestein GS, Alvaro-Garcis JM, Maki R (1990)
Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 144, 3347–3353
4. Hannum CH et al (1990)
Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343, 336–340
5. Hubbard JR, Steinberg JJ, Bednar MS, Sledge CB (1988)
Effect of purified human interleukin-1 on cartilage degradation. *J. Orthop. Res.* 6, 180–187
6. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B (1986)
Interleukin-1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8749–8753
7. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM (1987)
Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J. Immunol.* 138, 1464–1468
8. Van den Berg WB, Van de Loo FAJ, Otterness I, Arntz O, Jooster LAB (1991)
In vivo evidence for a key role of IL-1 in cartilage destruction in experimental arthritis. In *Drugs in Inflammation*. M. J. Parnham et al., eds. (Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz) 159–164
9. Wehling P, Bandara G, Evans CH (1989)
Synovial cytokines impair the function of the sciatic nerve in rats: a possible element in the pathophysiology of radicular syndromes. *Neuro Orthop.* 7, 55–59
10. Wood DD, Ihrle EJ, Hamerman D (1985)

Release of Interleukin-1 from human synovial tissue in vitro. Arthritis Rheum. 28, 853—862

Patentansprüche

1. Methode eines Gentransfersystems zur Einschleusung therapeutischer Gene mittels Vektoren in Körperzellen und anschließender davon abhängiger Expression therapeutischer Proteine und Sekretion dieser therapeutischen Proteine in den extrazellulären Bereich durch die gentechnisch veränderten Körperzellen. 5
2. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperzellen Nervenzellen, immunkompetente Zellen, mesenchymale oder ektodermale Zellen sind. 10
3. Methode nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperzellen periphere Nervenzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Chondrozyten sind. 15
4. Methode nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten therapeutischen Proteine entzündungshemmende, schmerzstillende, regenerierende, immunsteigernde, hypotensive, antidegenerative und antiarthrotische Eigenschaften aufweisen. 20
5. Methode nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten therapeutischen Proteine zur Gruppe der Zytokine, seiner Inhibitoren, zur Gruppe der Opiate, zur Gruppe der Prostaglandine und deren Hemmstoffe gehören. 25
6. Methode nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten therapeutischen Proteine zur Gruppe der Interleukininhibitoren gehören. 30
7. Methode nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten therapeutischen Proteine zur Gruppe der Interleukin-1 Inhibitoren gehören. 35
8. Methode nach Anspruch 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene durch einen Vektor in vivo direkt in das Zellgebiet eingebracht werden, und das der Vektor zur Gruppe der Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpesviren oder Liposomen gehört. 40
9. Methode nach Anspruch 1—8, dadurch gekennzeichnet, daß die zu verändernden Zellen aus dem Körper transplantiert werden, die teilungsfähigen Körperzellen in vitro selektioniert werden, die Gene durch einen Vektor in vitro direkt in die Zellen eingebracht werden, und daß der Vektor aus der Gruppe der Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpesviren oder Liposomen gehört, und daß diese gentechnisch veränderten Zellen in den Körper retransplantiert werden und therapeutische Proteine exprimieren und in den extrazellulären Bereich sezernieren. 45
10. Methode nach Anspruch 1—9, dadurch gekennzeichnet, daß insbesondere degenerative Erkrankungen der Wirbelsäule und der Nerven Gegenstand der erfundenen Methode sind. 50

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Gentransfer zum kleinen Wirbelgelenk

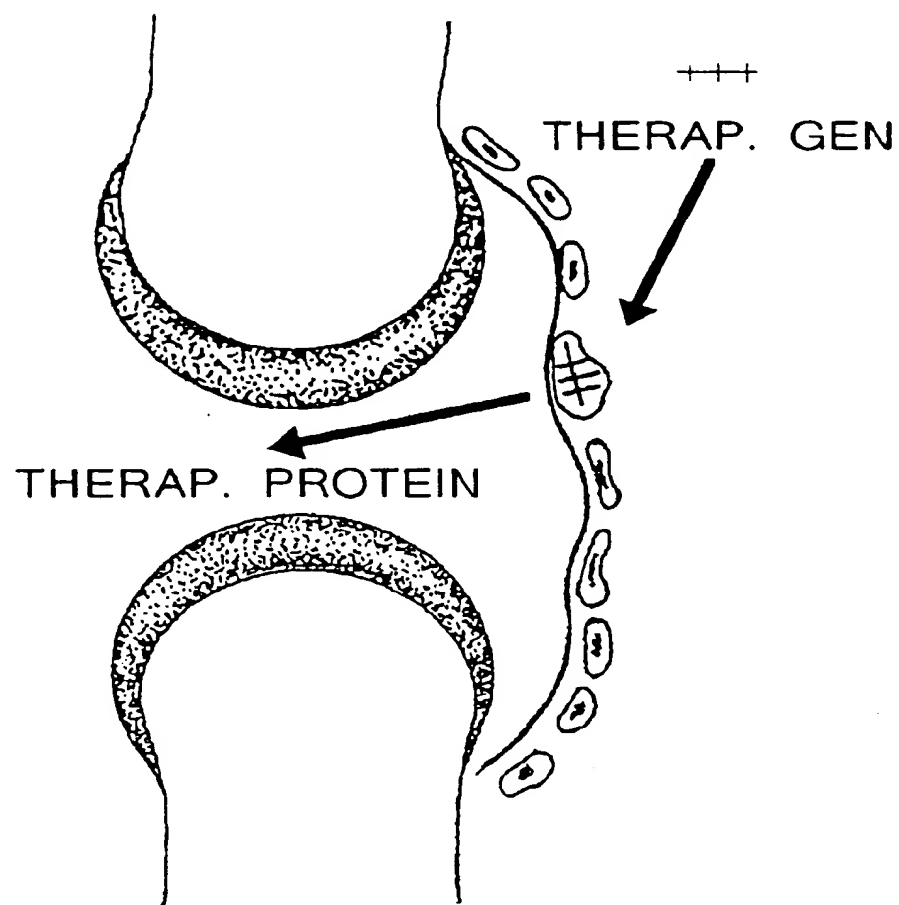
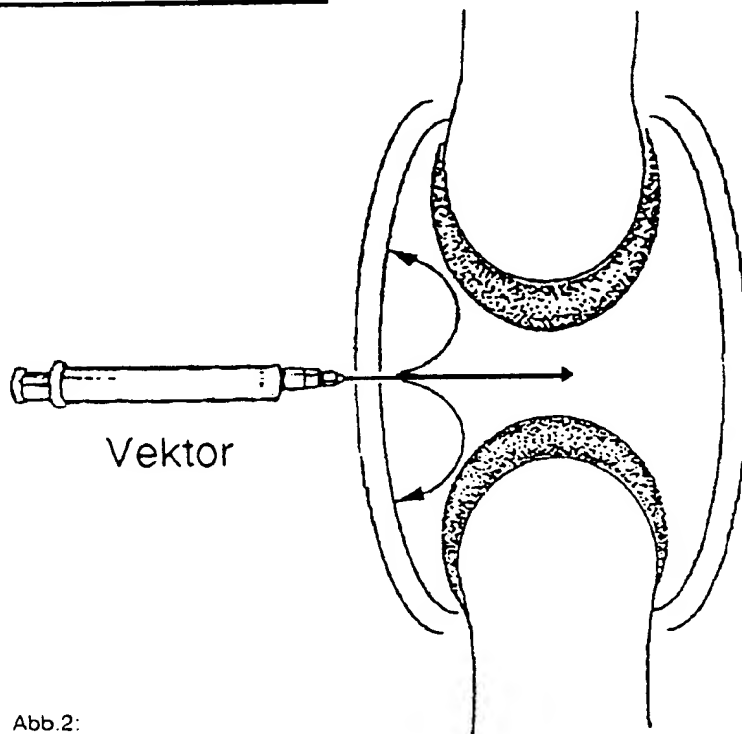


Abb.1

Direkte Methode



Indirekte Methode

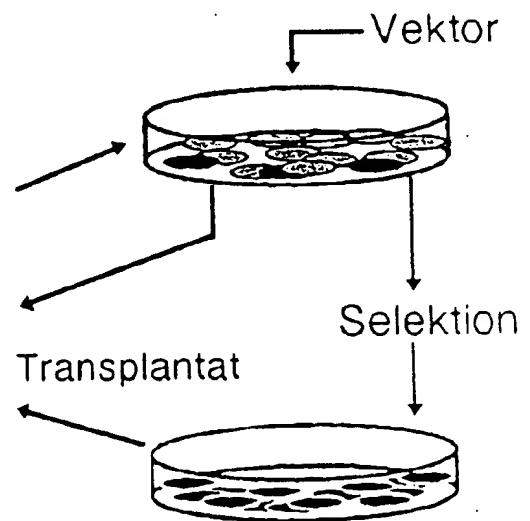


Abb.2:



Abb. 3

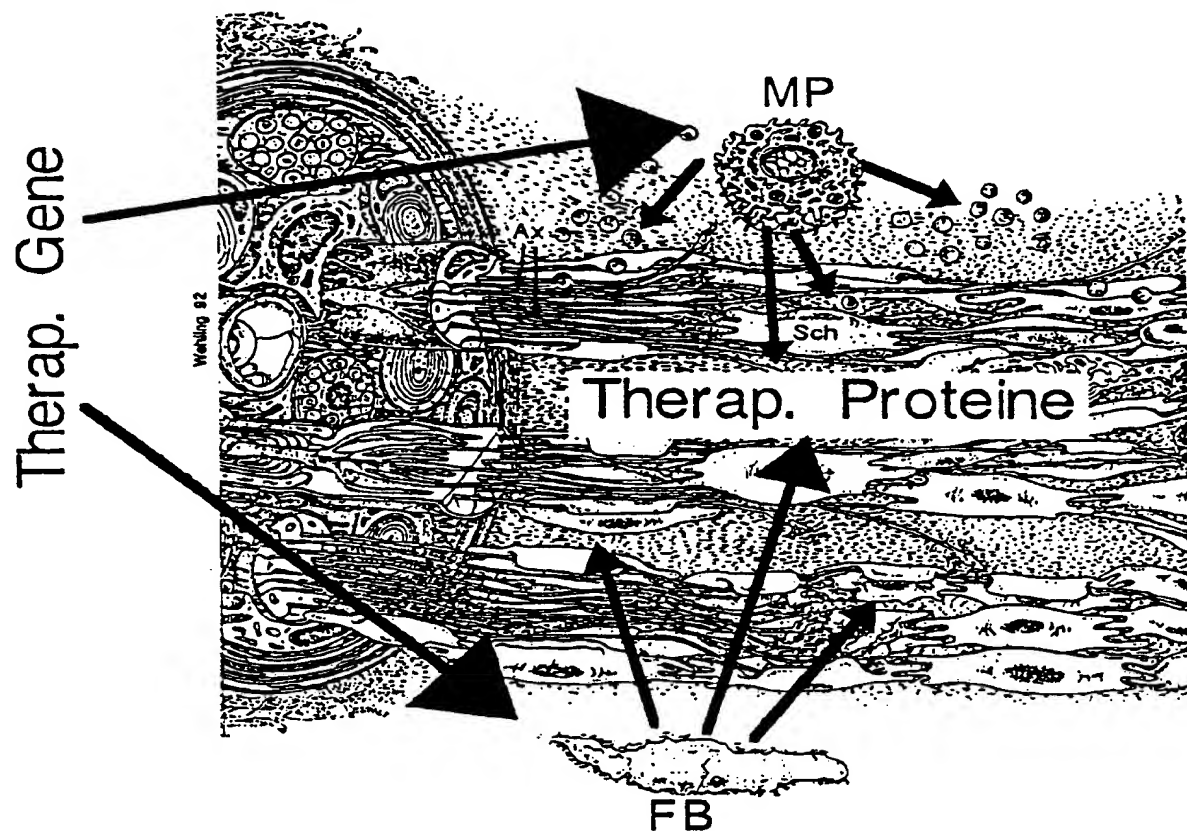


Abb. 4

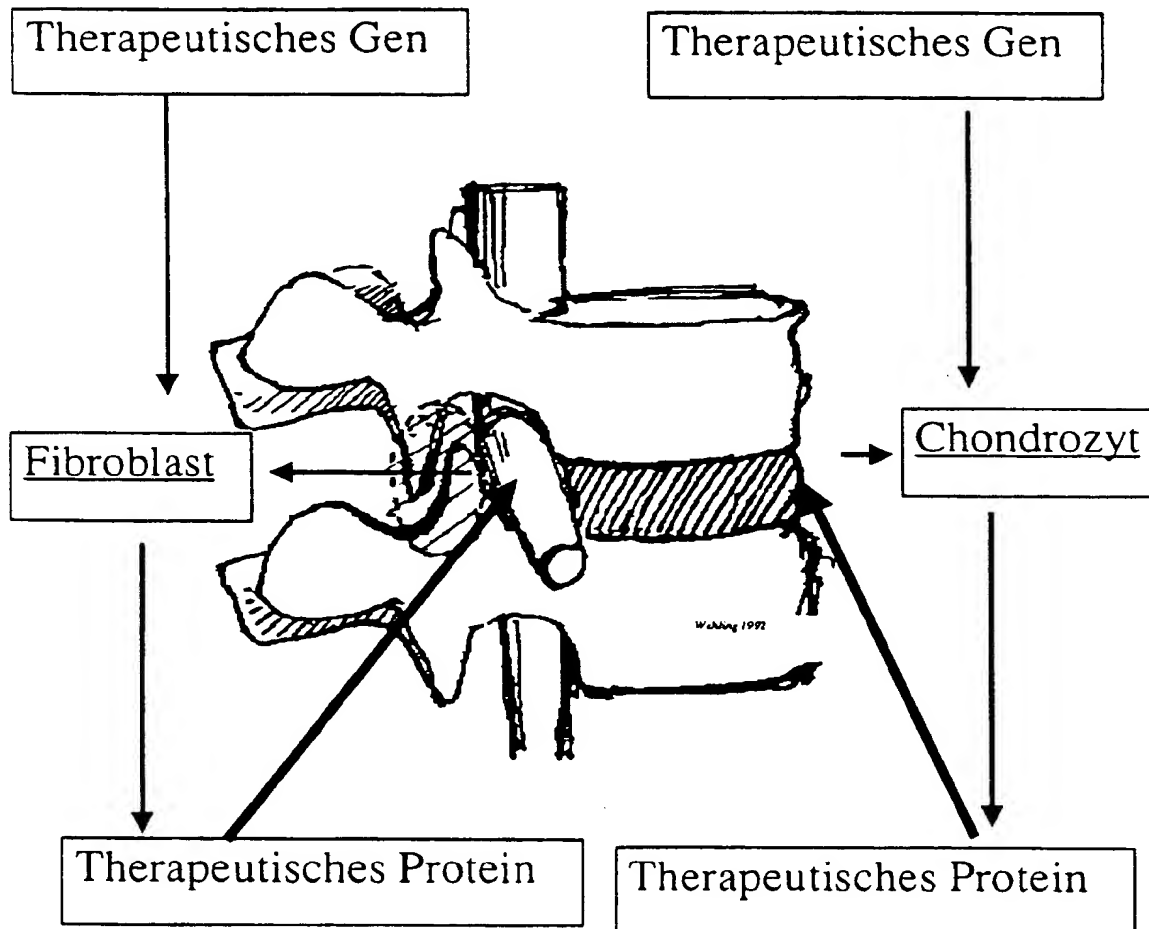


Abb.5